

PID 9056

Empleo de la abeja melífera como bioindicador de contaminación ambiental con herbicidas en áreas cultivadas con soja en la Prov. de Entre Ríos y su relación con el contenido residual en la miel

Baldi Coronel, Bertha; Vallejos, Omar; Pancrazio, Gastón; Lopez Muller, Nadia; Goldaracena, Carlos; Taus, María

AUTORES: Facultad de Bromatología, Universidad Nacional de Entre Ríos (Argentina).

CONTACTO: bbaldi@fb.uner.edu.ar

Resumen

La Provincia de Entre Ríos posee excelentes condiciones agroclimáticas para el desarrollo de la apicultura aprovechando las áreas cultivadas para la producción y polinización. El cultivo que ocupa mayor territorio es el de soja y para controlar sus malezas se utiliza el herbicida glifosato. Las abejas se revelan muy sensibles a los agroquímicos y responden a su uso en el ambiente muriendo o reteniendo los residuos en su organismo comportándose como verdaderos biosensores del ambiente. Según el grado de contaminación, el poder residual del herbicida y otros factores, la mortandad de abejas será importante o total. Este trabajo trata de demostrar la utilidad de la abeja melífera como biomonitorizador ambiental y obtener información sobre el nivel de contaminación por glifosato, en una zona cercana a cultivos de soja. Se realizó un muestreo de abejas muertas durante una temporada completa y se desarrolló una metodología analítica para determinar glifosato en abejas muertas y miel. Se contrastaron los resultados (porcentaje de abejas muertas) con datos del relevamiento a campo, viento (intensidad y dirección) y cielo (despejado, cubierto, semicubierto), temperatura ambiente y registros pluviométricos del Servicio Meteorológico Nacional. Se elaboraron gráficos de evolución de la mortalidad en función del tiempo, abarcando la época de siembra y cosecha de soja.

Palabras clave: abeja melífera; contaminación ambiental; indicadores biológicos; miel; apicultura

I. Objetivos General Propuesto

I.1 Objetivo General

El objetivo general que se persigue es poder realizar un estudio de la situación de contaminación por herbicidas, en particular con glifosato por ser el más usado, en un sector agropecuario importante como la Provincia de Entre Ríos, mediante el uso de las abejas como indicadores biológicos. Corroborar la información con el análisis de los residuos de esta sustancia en la miel y en abejas muertas.

Conocer y evaluar los riesgos a los que la población humana se ve expuesta en la cadena alimentaria por el uso de herbicidas.

I.2 Objetivos Específicos:

Establecer los efectos del uso humano de los recursos naturales sobre la dinámica de polinización en zonas agropecuarias de la Pcia de Entre Ríos.

- Determinar la presencia de sustancias contaminantes como el glifosato en el ambiente en las áreas de cultivo a través de biomonitorio y favorecer la producción de productos orgánicos de la colmena.
- Comprobar la utilidad potencial de las abejas como herramientas de monitoreo para tomar medidas de prevención, conservación y manejo en los ecosistemas.
- Conocer la calidad de la miel, en relación al contenido de residuos como uno de los principales productos de exportación de esta región.
- Poner a punto metodologías analíticas que permitan medir y estimar la concentración de herbicidas en insectos y miel, asociados a las modalidades de cultivo y prácticas agrícolas de la zona.
- Proporcionar herramientas válidas, resultado de ésta investigación puntual, para próximas investigaciones que alcancen al biomonitorio ambiental para el control del uso de agroquímicos.

Objetivos Cumplidos: Los objetivos se cumplieron en su mayoría excepto en lo que respecta a poner a punto una metodología analítica para la determinación de glifosato en matrices como abejas muertas y miel. Por tal motivo tampoco no se pudo saber la calidad de la miel en relación al contenido de residuos.

II. Marco teórico

Entre Ríos cubre una extensión aproximada de 76.550 km². Como la mayoría de las provincias argentinas, se ha dedicado históricamente a la agricultura y la ganadería. Esta superficie está destinada a pasturas cultivadas, montes naturales, cítricos con forestación de pinos, eucaliptos y salicáceas y campo natural sin monte. [1]

La adopción de la siembra directa, cultivos transgénicos, herbicidas y fertilizantes como herramientas tecnológicas, fue realizada en estos últimos años a ritmos sorprendentemente altos, por tratarse de procesos no dirigidos estatalmente. Datos proporcionados por la Bolsa de Cereales de Entre Ríos indican que el área sembrada de soja fue de 1.312.350 ha, el área cosechada de 1.312.350 ha, el rendimiento promedio provincial de 2.300 Kg/ha con una producción de 3.018.241 toneladas.

La soja es una planta de la familia de las leguminosas, pertenece a la especie de *Glycine max* (L.). Es una planta herbácea anual, de primavera-verano, cuyo ciclo vegetativo oscila de tres a siete meses. Las temperaturas óptimas para el desarrollo de la soja están comprendidas entre los 20 y 30° C, siendo las temperaturas próximas a 30° C las ideales para su desarrollo. Las temperaturas óptimas oscilan entre los 15 y los 18° C para la siembra y los 25° C para la floración. Respecto a la humedad, durante su cultivo, la soja necesita al menos 500 mm de agua. Se desarrolla en suelos neutros o ligeramente ácidos. Con un pH de 6 hasta la neutralidad se consiguen buenos rendimientos. La soja es una planta poco agresiva y por lo tanto muy sensible a la competencia con las malas hierbas, durante las fases iniciales de su desarrollo.

Para el control de las malas hierbas se emplea principalmente el método químico con sustancias de aplicación en pre-siembra, en el caso de la soja RR, el control químico de malas hierbas también puede realizarse en post-emergencia, es decir una vez que han aparecido en superficie las primeras hojas. El herbicida usado en este caso es el glifosato.

El uso de herbicidas no solo se ha generalizado para la agricultura, sino también en ambientes tan cotidianos como las vías férreas y carreteras para controlar los pastizales, y para uso doméstico.

La ciencia de los pesticidas es un campo muy dinámico en el que continuamente se desarrollan nuevos compuestos con el fin de combatir nuevas plagas. Por otro lado la creciente preocupación por los

riesgos toxicológicos de los pesticidas obliga a desarrollar productos de menor persistencia y toxicidad, y fácilmente degradables en el medio ambiente. Por ejemplo se ha producido un claro desplazamiento en el uso de pesticidas apolares de larga persistencia, como compuestos organoclorados, que se acumulan en la fracción lipídica de la cadena alimentaria humana, hacia el uso de pesticidas más polares y más fácilmente degradables como los N-metilcarbamato, entre otros [2].

Las formas de aplicación de los agroquímicos en los cultivos varían desde las fumigaciones terrestres o aéreas a espolvoreo, aplicaciones por contacto y pulverizaciones.

Dentro de las aplicaciones las aéreas son la más reciente incorporación; son muy útiles para grandes extensiones de campo, permitiendo terminar la tarea en poco tiempo.

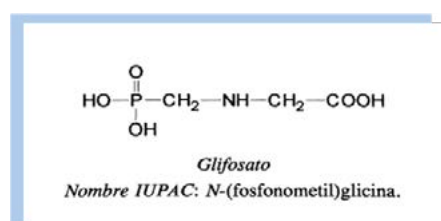
En este tipo de aplicación, la distancia entre el suelo (blanco) y la avioneta es bastante grande al tener imposibilitado del vuelo al ras del piso. Esto trae como consecuencia grandes derivas, provocadas tanto por el viento natural como por el generado al paso de la avioneta y la mayor posibilidad de contaminación en zonas no destinadas al cultivo. [3].



Por “deriva” se entiende el desvío aéreo de una porción del producto fitosanitario aplicado, hacia un lugar no deseado. El fenómeno “deriva” es el responsable de los problemas estudiados de contaminación de “sitios no blanco”, situados a mayores distancias, tales como otros cultivos, fuentes de agua, especies animales, etc. Por lo que es fundamental reconocer su existencia para así aplicar correctamente los productos fitosanitarios.

El glifosato, lanzado al mercado en 1971 por Monsanto, siendo uno de los descubrimientos más importantes del siglo XX, es el herbicida de mayor uso en el mundo por su alta efectividad y porque puede aplicarse de diversas maneras. Es un herbicida no selectivo de acción sistémica, de amplio espectro, utilizado para el control de muchas especies de malezas, en tratamientos de post emergencia del follaje. No actúa sobre las semillas que existieran debajo del suelo y tampoco es absorbido por las raíces.

FIGURA N° 1: Formula del glifosato



FUENTE: Sancho, 1994.

En las formulaciones comerciales si bien el principio activo es el glifosato, no están compuestas en un 100% por esta sustancia, sino que esta acompañado de otras sustancias, denominadas por algunos como “ingredientes inertes” y surfactantes.

A continuación se presentan algunos datos sobre la persistencia del glifosato en distintos ambientes, recopilados por [4], [5].

- 249 días en suelos agrícolas de Finlandia.
- Entre 259 y 296 días en 8 sitios forestales de Finlandia.
- Entre 1 y 3 días en 11 sitios forestales de Suecia.
- 335 días en un sitio forestal en Canadá.
- 360 días en 3 sitios forestales de Canadá.

Debe destacarse que las condiciones de degradación del glifosato dependen de las características climatológicas a distintas latitudes, siendo su persistencia mayor en climas fríos y menor en climas cálidos y tropicales [5] y puede ser tomado por las plantas y movido a las partes que se usan como alimento.

En Argentina la agricultura moderna responde a modelos económicos de rentabilidad que implican el empleo de técnicas y uso de agroquímicos que aumentan o garantizan los rendimientos de la producción. El control químico parece ser una de las opciones más utilizadas a mediano plazo. El problema abarca a toda la cadena de la producción y la comercialización, es decir condiciona el comercio de productos agrícolas [6].

Desde el punto de vista legal el [7], ha establecido el LMR de glifosato para distintos granos y productos vegetales se muestran en la siguiente tabla.

TABLA N° 1: Límite Máximo de Residuos de glifosato establecido por el Codex Alimentarius 2009

Producto	LMR mg/Kg. *
Cereales en grano	30
Frijoles secos	2
Maíz	5
Salvado de trigo sin elaborar	5
Semillas de girasol	7
Soja seca	20

Se puede observar que la legislación argentina es más exigente en cuanto a los LMR de este compuesto que el Código Alimentarius. Para otros alimentos como la miel, los límites para glifosato no están establecidos.

Para aguas de bebida, la normativa argentina establece un límite máximo de glifosato de 0,3 mg/lit [8] La Organización Mundial de la Salud [9], recomienda un valor de 0,9 mg/lit de AMPA en agua sobre la base de la IDA de 0,3 mg/Kg de peso corporal combinándose éste con el glifosato aplicándole un factor de incertidumbre de 100. En reunión de JMPR de la FAO los expertos recomiendan una IDA (Ingesta diaria admisible) para la suma de glifosato y AMPA de 0,1 mg/Kg de pc. [5].

Los Antecedentes sobre la incidencia de las aplicaciones en la Provincia de Entre Ríos indican que en febrero de 2004 quince personas resultaron intoxicadas en el departamento Gualaguaychú, por causa de un agrotóxico. En la zona rural del departamento Paraná se observó un aumento de la mortalidad perinatal y una alta incidencia de embarazos anembrionados correlacionados con el incremento en la superficie sembrada con soja y el consecuente uso de agroquímicos. Desde el hospital de la localidad

de Cerrito, el médico Darío Gianfelici comprobó que las enfermedades de las vías respiratorias se duplicaron, mientras que las afecciones de piel se cuadruplicaron en los últimos diez años. Pablo Basso, director de Epidemiología del Ministerio de Salud provincial admite: “Hay varios estudios que relacionan el uso indiscriminado de agroquímicos con la aparición de diversas patologías”. El funcionario agrega: “La supuesta inocuidad de glifosato es falsa, si hay algo que todos tenemos claro es que el glifosato no es agua bendita”.

En Entre Ríos existe una ley de plaguicidas que fija una distancia mínima de 50 metros entre el límite del terreno sembrado y el caserío para los casos de fumigaciones terrestres y de 200 metros para las fumigaciones aéreas. Pero esta normativa no se cumple. Esta situación de la agricultura entrerriana alcanza también a otras industrias agropecuarias como la apicultura. La actividad apícola cumple roles ecológicos, comerciales y sociales múltiples, escasamente valorados en nuestro país, donde está permanentemente amenazada por el uso poco cuidadoso y contaminante de sustancias químicas, de las prácticas agrícolas y las modalidades de cultivo.

La República Argentina es uno de los países con mayor tradición apícola en Latinoamérica ubicándose como 1º exportador y 3º productor mundial de miel. Produce el 70 % de América del Sur, el 25 % de toda América y entre el 5 y 7 % del total mundial.

Las exportaciones mundiales de miel alcanzan a 370 mil Tn, Argentina participa con el 25 % del total comercializado, lo que lo ubica entre los líderes del mercado internacional de mieles.

El rendimiento promedio nacional de miel se encuentra entre los más altos del mundo, alrededor de los 30 y 35 Kg./colmena/año. En algunas zonas se obtienen cosechas promedio de 60-70 Kg./col/año, de acuerdo a la zona geográfica y al manejo que se realice. En Buenos Aires rondan entre 30 y 45 Kg. La distribución regional de la producción muestra una fuerte concentración en la región Pampeana que se destaca entre las provincias productoras (Gráfico 3). Es preciso mencionar que la apicultura se ha extendido al resto de las provincias. Actualmente existen polos de desarrollo en Santiago del Estero, Misiones, Tucumán, Neuquén, Chaco, Chubut, entre otras. Una característica que ofrecen nuestros sistemas productivos y climas, es la posibilidad de obtener diferentes tipos de mieles y de orígenes botánicos, herramientas de diferenciación aún no muy desarrolladas.

La Provincia de Entre Ríos por sus características agroecológicas y la gran variedad de flora melífera, posee excelentes condiciones para la producción apícola, por lo que se ha desarrollado esta actividad en todo el ámbito provincial y en relación con la agricultura intensiva se ha manifestado una mayor inclinación por la explotación comercial de la miel. En este ámbito la abeja melífera representa el insecto polinizador más abundante de que se dispone; en algunos casos es insuficiente para realizar una labor completa de polinización, especialmente en zonas donde se destinan grandes extensiones a los cultivos intensivos [10]. Este autor publica en su libro una frase de James I. Hambleton, autoridad en materia de polinización entomófila (por insectos), que dice “El principal papel de la abeja melífera esta en la polinización de los numerosos cultivos agrícolas para la producción de semilla o fruta, siendo la miel y la cera meros productos secundarios de la polinización. Sin la ayuda de los insectos para efectuar la polinización, muchas especies de plantas no producirían semillas o fruta aunque hayan sido bien cultivadas”. Actualmente no es raro observar que en las proximidades de cultivos (cítricos, eucaliptos, oleaginosas, etc.) se encuentran ubicadas colmenas por lo que resulta ya indiscutible que las abejas, y con ellas los apicultores, participan en medida considerable en la producción agrícola. Gracias a este papel, el patrimonio privado de los apicultores se convierte en patrimonio público, dado que el beneficio derivado de su trabajo se deja sentir en toda la colectividad y estableciéndose así un lazo recíproco entre abejas, medioambiente, agricultura y hombre, que debe ser protegido [11].

El modelo agropecuario llevado adelante por los productores basado en la deforestación, el monocultivo de soja, la utilización de variedades transgénicas y la aplicación de herbicidas, insecticidas y fungicidas inciden muy desfavorablemente en la apicultura y en la vida de las abejas, no solo las deja

sin alimento sino que estos plaguicidas provocan mortandad de poblaciones enteras. Ya sea aplicado a las semillas con anterioridad a su siembra como en diferentes etapas del cultivo de los vegetales, pueden alcanzar tanto a las abejas como a su alimento. En muchos aspectos, las abejas constituyen un indicador ideal de la degradación ambiental y de la violación de los tratados. Puesto que muchas plantas requieren las abejas para polinizarse, estos insectos existen casi por todos lados sea en forma silvestre o en colmenas industriales. Su adaptabilidad al control humano las hace particularmente útiles para servir como ubicuos medidores de la pureza del ecosistema y se comportan como verdaderos biosensores del ambiente. Según el grado de contaminación, el poder residual del herbicida y otros factores, la mortandad de abejas será importante o total, poniendo en peligro la producción de alimentos. Usando las guías y los requisitos como un bosquejo, los científicos han desarrollado algunas estrategias exclusivas y creativas para la vigilancia. Una en especial, ha reunido las ligazones ecológicas y las necesidades de una vigilancia precisa en un único indicador biológico, que podemos llegar a utilizar en una gran variedad de escenarios de negociación. Sin embargo, todavía es más útil el producto que fabrican. La miel de abejas es el resumen de la actividad total de los insectos: acumulación de polen de una variedad de plantas y agua para beber de fuentes superficiales, abarcando una vasta área. De ese modo, la miel se convierte en un medio colectivo sensible sobre el cual podemos medir la relativa concentración de los contaminantes que incorpora.

La “matriz abeja” integra espacio y tiempo de manera puntual y a corto plazo. La “matriz miel” integra espacio y tiempo, pero en plazos más prolongados por la reelaboración y deshidratación del néctar. Por lo tanto, la presencia de contaminación puede identificarse a través de la “matriz abeja”, y su eventual persistencia puede ser confirmada a través de la “matriz miel”. En nuestro país el uso de indicadores biológicos de contaminación no es muy difundido ni muy utilizado aún. No obstante ello otros países presentan más antecedentes en el tema; y en el caso de las abejas, desde hace varios años, son utilizadas como bioindicador por tener bajo su control la contaminación debida a varios tipos de contaminantes. En cuanto a la contaminación ambiental por la aplicación de agroquímicos en zonas agroindustriales, a pesar de la importancia que el problema reviste, no se han registrado publicaciones sobre monitoreos de estas sustancias en dichas zonas. Solo se sabe que existe una problemática puntual respecto de la aplicación de plaguicidas y/o herbicidas en los cultivos agrícolas.

II. Marco Metodológico

Determinación de la zona de monitoreo:

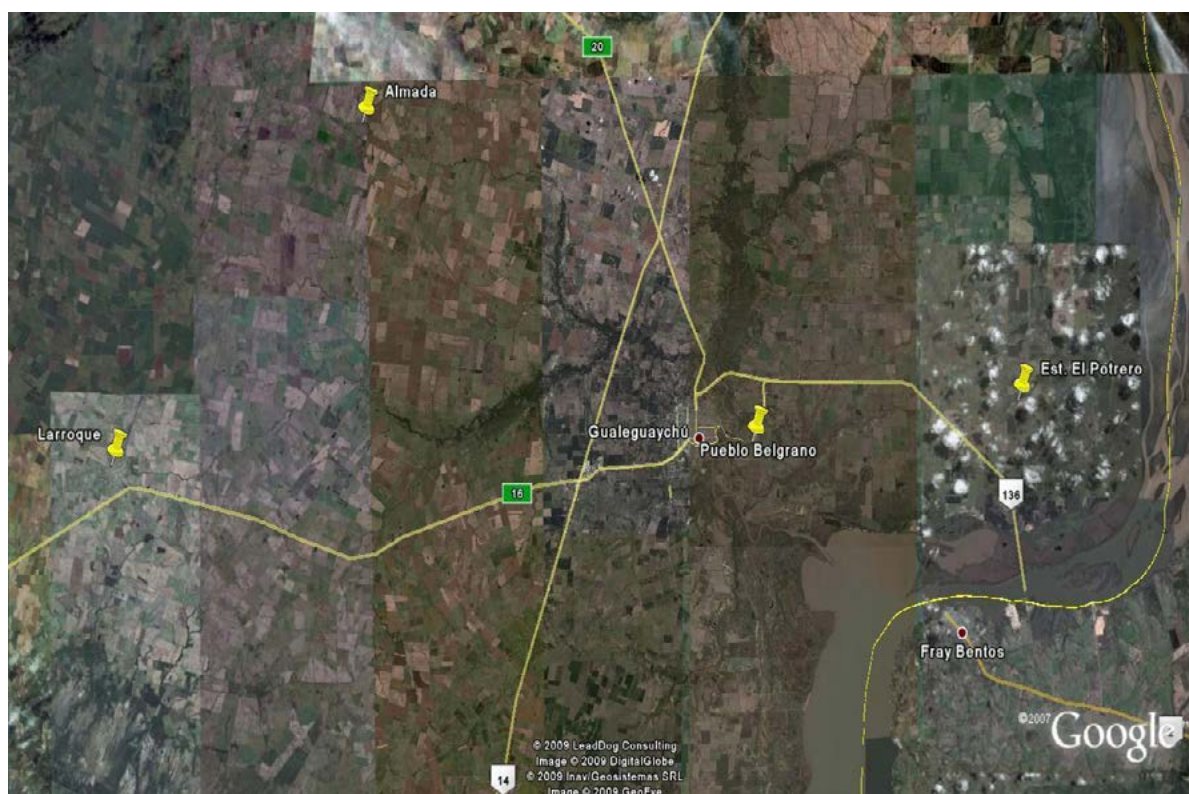
Se tomó como zona de estudio, las afueras de la ciudad de Gualaguaychú, Pcia. Entre Ríos, y se eligió un predio ubicado en Urquiza al Oeste, parada 16, que se encuentra cercano a cultivos de soja.

En ese lugar se colocó un apiario experimental, y se tomó al mismo como estación de monitoreo de la contaminación ambiental. Las colmenas fueron provistas de jaulas especialmente diseñadas para la cosecha de las abejas muertas.

La duración del monitoreo abarcó el periodo de actividad de las abejas, entre 30 y 36 semanas. Las abejas tienen, normalmente una vida media de aproximadamente 20 días; hay un umbral de mortalidad natural que constituye por consiguiente el “el umbral de normalidad.” (de 100 a 120 abejas).

Para asegurar una homogeneidad de la muestra, se tomaron como mínimo 3 gr de abejas muertas.

Al final de este procedimiento se obtuvieron datos que permitirán conocer el curso de la mortalidad durante el periodo de prueba, y correlacionar con las fumigaciones producidas en los cultivos cercanos al apiario.

Foto N° 1: Zona de muestreo

Zona1: Tambo Sack Ruta 42. Gualeguaychú: muestras 3,4 y 5.

Zona 2: El Potrero Ruta 42 y calle N°3: muestras 6,7, y 8.

Zona 3: El Potrero calle N°5, entre 7 y 9: muestras 1,2, 11,13 y 14,

Zona 4: Urquiza al Oeste. Parada 15. Gualeguaychú: muestras 15 en adelante

Relevamiento de la cobertura vegetal y las condiciones agroclimáticas de la zona:

Para el relevamiento de las condiciones agroclimáticas se consultó al servicio meteorológico del INTA y para la producción sojera, se tomaron los datos publicados por la Bolsa de Cereales de la Pcia. de Entre Ríos. Se realizó un relevamiento de la cobertura de cultivos agrícolas en la zona: mapeo vegetacional a una distancia de 2 Km alrededor del apiario experimental.

Foto N° 2: Ubicación del apiario experimental



Fuente: propia, 2009.

Ubicación de las trampas para la recolección de abejas muertas:

La recolección de las abejas muertas se realizó con jaulas especiales tipo “Underbasket”, (o jaulas de Gary). El muestreo se realizó cada 7 días durante el período de julio a marzo, período en que las abejas salen al campo a pecorear. Es decir que se tomaron las muestras de abejas muertas en el período de mayor actividad.

Foto N° 3: Trampa para muestrear abejas muertas

Fuente: propia, 2010

El diseño de la trampa fue proporcionado por un productor Apícola, el Señor Hugo Tasinato de Amébar [12], Provincia de Santa Fé, quien obtuvo el plano del Dr. Eric H. Erickson Jr., Director de la Unidad de Investigaciones Apícolas del USD A de Tucson (Arizona) y fue desarrollada por el Dr. F.E. Todd, Jefe de Investigaciones Apícolas del USDA y modificada por E.L. Atkins y L.D. Anderson, entomólogos de la Universidad de California. Estas trampas fueron ideadas por el Dr. F.E. Todd para evaluar los da-

ños en las colmenas producidos por agroquímicos. Después de una serie de ensayos poco confiables trató de conseguir mediciones de abejas muertas más veraces, ya que gran parte de ellas eran transportadas lejos de las colmenas por las obreras encargadas de la higiene, las moribundas caminaban o se arrastraban alejándose lentamente del lugar, o había pájaros que las aprovechaban como alimento. Con una de las primeras trampas, Todd eliminaba la remoción del 50% de abejas caídas, mediante pruebas de campo realizadas en 1959.

La misma ha sido construida con chapa galvanizada, soldada manualmente, con dimensiones aproximadas a un alza standard. El frente abierto se adapta a la colmena asegurándolo con cuatro clavos.

Tratamiento de la muestra y relevamiento de la mortalidad:

Las abejas muertas recogidas se contaron y pesaron para confeccionar las tablas de mortalidad. Primeramente se eliminaron los zánganos por cuanto ellos no participan de la recolección de polen y néctar, por lo tanto no son vehículos del herbicida tanto para su organismo como para la colmena. Luego de contarlas y pesarlas, se mantuvieron a -20°C a fin de evitar que se produzcan alteraciones que afecten la estabilidad del herbicida en la muestra.

El dato de mortalidad se usó para confeccionar gráficas de evolución de la mortalidad y formular conclusiones sobre la influencia de los tratamientos efectuados en la zona.

Foto N° 4: Limpieza y conteo de abejas



Fuente: propia, 2010

Foto N° 5: Muestra de abejas muertas.



Fuente: propia, 2010

Se diseñaron protocolos para el registro de los datos de campo:

-Para observación del comportamiento de la colonia: fecha, hora, viento (intensidad y dirección) y cielo (despejado, cubierto, semicubierto), los datos de temperatura y registros pluviométricos fueron aportados por el Servicio Meteorológico Nacional). Otras variables que se observaron surgieron de la necesidad de determinar diferencias de comportamiento entre colonias, (actividad en las piqueras y a las diferencias entre colmenas, vuelo normal; poco vuelo; ausencia de vuelo); y las visitas para tomar estos registros se realizaron semanalmente.

- Para los datos de mortalidad: número y peso de abejas muertas por semana durante el período de prueba.

Recolección de la muestra de miel:

Se recogieron muestras de miel madura de las colmenas colocadas en la estación de monitoreo en la época de cosecha. Es decir, en diciembre, enero y febrero, si la colmena posee miel madura. Esto viene determinado por las condiciones agroclimáticas, de floración, etc.

Se extrae la miel de los panales por prensado, luego se los filtra a través de un cedazo grueso para

retener impurezas y se guarda en frascos de vidrio.

Las muestras se mantuvieron a temperatura de refrigeración hasta su análisis.

Foto N° 6: Muestra de miel



Fuente: propia. 2010

Puesta a punto de la metodología analítica y determinación de glifosato en abejas muertas, y miel: la metodología se adaptará y optimizará a partir de antecedentes bibliográficos [13]; [14]; [15]. Se trabajó con una técnica cromatográfica por HPLC, con detección en UV, previa derivatización del glifosato con FMOC-Cl (9-fluorenilmetil clorformato) en buffer borato, adaptando las fases de extracción, clean-up y derivatización para matrices como abejas y miel.

Para miel se utilizó cromatografía LC MSMS con la cual se obtuvieron resultados más significativos.

III. Síntesis de Resultados

III.1. Resultados de la observación a campo: La evolución de la colonia en cuanto a crecimiento y desarrollo se mostró de forma normal durante el período de muestra.

Del comportamiento y vuelo de las abejas se observó un buen flujo de entrada y salida de pecoreadoras, con alta actividad en la piquera. En principio, mostraron cierta resistencia a la entrada a la colmena por la parte superior de la trampa colocada en la piquera. Encontraron rápidamente la forma de entrar por otro lado, un espacio libre que quedaba entre la trampa y la piquera. Por este motivo se modificó la misma a fin de eliminar este espacio y obligar a las abejas a entrar por la rejilla superior. Una vez solucionado este inconveniente, se pudo muestrear desde la bandeja, no obstante ello, se observó una gran cantidad de abejas muertas alrededor de las colmenas. Observándose que algunas de ellas morían con la carga de polen en sus patas, lo que hace suponer que volvían de pecorear y no alcanzaban a entrar en la colmena.

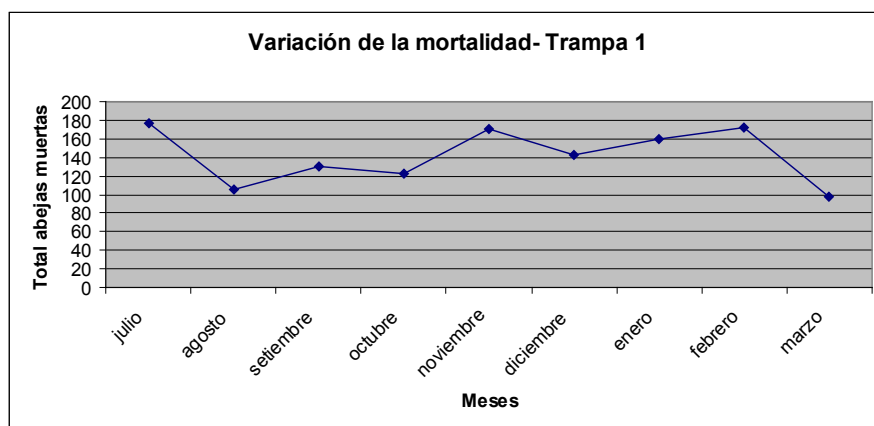
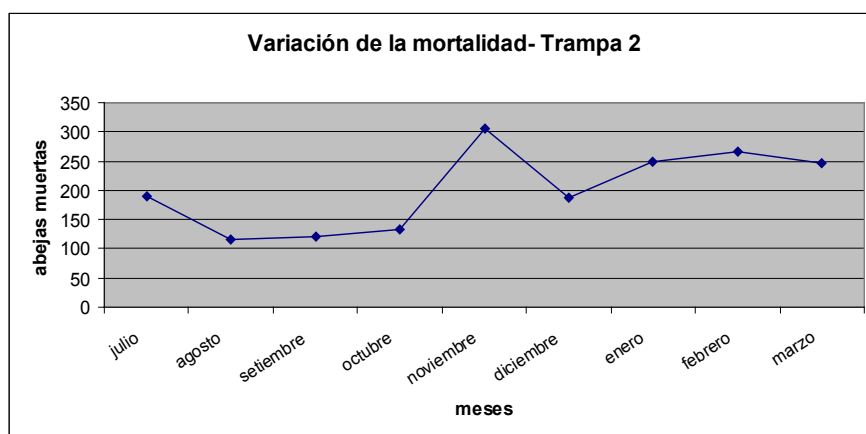
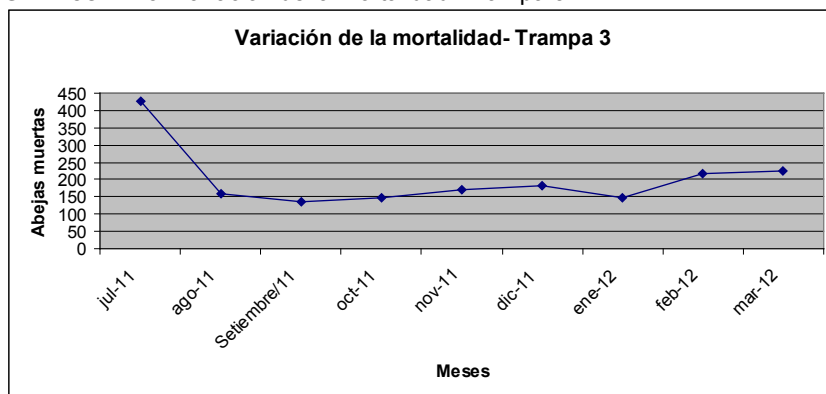
Estas situaciones particulares observadas nos hacen sugerir que deberían hacerse estudios más profundos siguiendo protocolos oficiales sobre la contaminación del ambiente, y usando métodos electrónicos de conteo de abejas y medición con sensores especiales de otros parámetros indicativos de la colmena, como temperatura, humedad, etc.

III.2. Del relevamiento de la cobertura vegetal se pudo comprobar que a 2 Km alrededor del apiario experimental se encuentran cultivos de soja, maíz y sorgo, y especies silvestres en estos porcentajes: 5% de soja, 20 % de sorgo, 10 % de maíz y el 62 % restante se compone de campos naturales enmalezados con chilca principalmente, cardos, primavera y también con una importante cantidad de acacias (espinillos). Completa la vegetación un 3 % de arboleda de eucalyptus los que se plantaron en forma de cortina para la protección de los cultivos.

De acuerdo a lo observado podemos interpretar que existe una reducción en diversidad de la cobertura vegetal entorno a los apiarios pero no influiría en la tasa de mortalidad de *A. mellifera* ya que como vimos ésta no supera los límites normales.

III.3. Resultados del biomonitoreo: se observó que en la mayoría de las trampas el número total de abejas por mes, no superó las 250, que sería el límite para considerar que estarían muriendo por contaminación (Gráficos 1, 2 y 3).

Excepto situaciones aisladas, un mes para la trampa 3 y 3 meses para la trampa 2, sin encontrarse una relación directa con el manejo de las fumigaciones. Las abejas tienen, normalmente una vida media de aproximadamente 20 días; hay un umbral de mortalidad natural que constituye por consiguiente el “el umbral de normalidad.” (de 100 a 120 abejas semanal). Los resultados obtenidos con las trampas, muestran que la tasa de mortalidad semanal varía en forma normal de acuerdo a factores propios de la colmena y del medio ambiente como el clima y con el promedio general de las colmenas bajo estudio. La trampa 1 y 2 presentan comportamientos similares, observándose que desde octubre a diciembre se produce la mayor mortandad. En cambio la trampa 3 presenta una tasa de mortalidad mayor que las anteriores en todo el período de muestreo, siendo el mes de julio el de mayor número de abejas muertas, luego desciende y en noviembre, diciembre y febrero vuelve a aumentar. Hay que tener en cuenta que la tasa de mortalidad de una colmena es el resultado de la interacción de muchos factores, como son: las características genéticas de las abejas, calidad y cantidad de la oferta floral circundante, nivel de sanidad de la colmena, y carga ambiental de sustancias artificiales como los herbicidas y/o plaguicidas. Se ha informado para Italia, valores de 125 abejas muertas por semana y por colmena, situación que en promedio supera ampliamente nuestro promedio semanal [16]. Esto indicaría que el lugar geográfico elegido y su entorno presenta mejores características ambientales y productivas, buena oferta floral, buena genética de las abejas y mejor calidad ambiental circundante. Igualmente es difícil relacionar directamente los cambios en la tasa de mortalidad solo con los cambios ambientales y/o climáticos. Durante la experiencia de monitoreo se encontró, en términos generales, que el uso de trampas en la evaluación de la tasa de mortalidad, ha permitido de forma accesible la toma de muestra para la generación de datos cuyo análisis brindaría los conocimientos necesarios y el acceso a información rápida sobre la situación tanto del apiario como de posibles contaminaciones en el medio que las rodea. En relación al diseño experimental, las colmenas usadas en el estudio permitieron tener un muestreo representativo del lugar geográfico donde se encuentran aunque la metodología es mejorable respecto a la cantidad de muestra y representatividad más equitativa entre ambientes. El uso de elementos electrónicos optimizaría el muestreo sin caer en el error humano de la toma de muestra, ya que a veces por la actividad de las abejas en el lugar, no siempre permite acercarse y juntar toda la muestra, ya que un cambio de clima, por ejemplo, ocasiona agresividad en el insecto. No obstante ello en primera instancia, podemos decir que el monitoreo ha permitido generar información científica sobre posibles efectos negativos de los cultivos circundantes especialmente el de soja, sobre la apicultura y sobre el medio ambiente.

GRÁFICO N° 1: Variación de la mortalidad- Trampa 1**GRÁFICO N° 2:** Variación de la mortalidad- Trampa 2**GRÁFICO N° 3:** Variación de la mortalidad- Trampa 3**Puesta a punto de la metodología analítica y determinación de glifosato en abejas muertas, y miel**

Primeramente se trabajó con una solución estándar de glifosato de pureza 99,7% Sigma-Aldrich. Se realizó el siguiente el plan de trabajo:

Identificación y cuantificación del analito en una solución estándar de glifosato.

Optimización del proceso de derivatización del analito para favorecer su detección por UV.

Estandarización de las condiciones cromatográficas e identificación de picos cromatográficos.

Prueba inicial de desempeño y/o confirmación del método en la solución estándar.

Extracción del analito de la matriz en estudio, en este caso, abejas muertas.

Detección y cuantificación del analito en las abejas.

Para abejas muertas: cromatográfica por HPLC, con detección en UV, previa derivatización del glifosato con FMOC-Cl (9-fluorenilmetil clorformato) en buffer borato, adaptando las fases de extracción, clean-up y derivatización para este tipo de matriz. Se adaptó y modificó el procedimiento desarrollado por investigadores del Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales de EE. UU, [17].

Para miel: se utilizó cromatografía LC MSMS. Equipo UPLC Waters Acquity. Detector TQD (Espectrómetro de doble masa) Software: MassLynx v4.1. Software: MassLynx v4.1.

Pruebas con la solución estándar: optimización del proceso de derivatización del analito para favorecer su detección por UV.

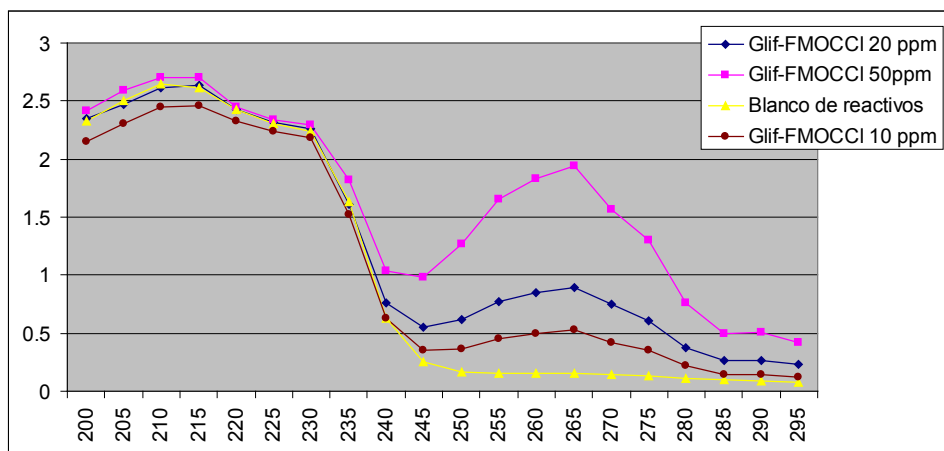
- Se eligió la derivatización precolumna, y se probaron dos procesos de derivatizaciones, los más usuales aconsejados por la bibliografía:

- Reacción de Derivatización N° 1: Proceso de 30 minutos con extracción líquido-líquido con acetato de etilo. [2]

- Reacción de Derivatización N° 2: Proceso de 24 horas sin extracción líquido-líquido, [18]

- Resultados favorables: mediante barridos espectrales de las soluciones de glifosato derivatizadas por ambos métodos se comprobó que la reacción de derivatización N°1 proporciona resultados satisfactorios.

GRÁFICO N° 4: Barrido espectral de soluciones de glifosato y blanco de reactivos derivatizados



El proceso de derivatización de 30 minutos, con extracción líquido – líquido con acetato de etilo, mostró buenos resultados [2]. Se obtuvieron barridos espectrales que confirman que la reacción de derivatización se concreta, se pudo ver que la longitud de onda adecuada para el trabajo es de 263 nm que es el máximo absorbancia de la solución del analito de distintas concentraciones

Estandarización de las condiciones cromatográficas e identificación de picos

La determinación de dicho analito se realiza por Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC, con un equipo de bombas binarias Waters 1225, con estabilizador de temperatura y detector UV-Visible con arreglo de diodos Waters 2996. Se trabajó con dos columnas, una RP-18 150 mm x 3.9 mm con relleno de 5 µm de diámetro de partículas y con una columna de intercambio aniónico débil (amino).

III.4. Resultados obtenidos con la columna RP-18

En la mayoría de los casos las corridas se realizaron a 30 °C. Fase móvil: se usó una mezcla de Acetonitrilo y KH₂PO₄ 0,025 M. (pH = 5,5) ensayándose la influencia del contenido de modificador orgánico en esta fase móvil, y para ello se trabajó entre 24 y 50 % de acetonitrilo (24:76, 25:75, 35:65 y 50:50).

Los resultados indican que a pH de 5,5: los picos cromatográficos resultan totalmente resueltos con un tiempo de análisis razonable. La concentración del buffer fosfato de 0,05 M proporciona buena resolución con tiempos de análisis cortos. Esta concentración sería la máxima ensaya para no perjudicar el sistema de bombeo del cromatógrafo. Se ha observado que a medida que disminuye la concentración del buffer, aumenta la retención. En nuestro trabajo se obtuvieron buenos resultados a una concentración de 0,025 M.

Longitud de onda: Para la detección se elige como λ_{ex} =263 nm en base a lo aconsejado por antecedentes bibliográficos de [19].

Temperatura: 30°C Flujo: se trabajó a un flujo de 1 y 0,8 ml/seg. Volumen de inyección: 20 µl.

Con este tipo de columna no se han obtenido resultados satisfactorios, ensayándose distintas concentraciones de fase móvil, no se a logrado mantener un tiempo de retención estable, consideramos que estamos en presencia de un analito complejo y teniendo en cuenta que se está realizando la detección en UV se puede comprobar la baja sensibilidad de este detector.

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta el momento, las condiciones cromatográficas más favorables son: Fase móvil: 35 % de acetonitrilo, 65 % KH₂PO₄ 0,025 M, pH = 5,5 ajustado con KOH 2M. Flujo: 1 ml/min. λ_{ex} =263 nm. Y las concentraciones menores del analito darían resultados más claros y reproducibles.

La puesta a punto de esta metodología se muestra muy dificultosa, creemos que también será trabajo ponerla a punto en una matriz compleja como la de abejas muertas y tan azucarada como la miel. También hay que considerar las características propias del compuesto mismo. El glifosato es soluble en agua, muy polar, poco soluble en solventes orgánicos y sensible al pH del medio y presenta cuatro estados iónicos de equilibrio. Estas características físicas y químicas hacen que su comportamiento respecto a estabilidad química, persistencia y su residualidad presente mucha variación según la característica del sustrato en que se encuentre.

III.5. Resultados obtenidos con la columna amino

Se trabajó con el mismo procedimiento de derivatización y las condiciones cromatográficas antes mencionadas exceptuando el volumen de inyección que se aumentó a 200 µl porque lo consideramos importante para el grado de selectividad y sensibilidad que se pueda alcanzar, así se lograron mejores resultados. Se presentan a continuación los cromatogramas obtenidos con dicha columna, del blanco de reactivos y soluciones patrones de 0,5 y 1,0 ppm.

Derivatización	Fase Móvil	Flujo ml/min	Temp. °C	Columna	Cc (ppm)	Tr (min)	Área µV*sec.
Sancho y col. 2003	35-65 %	1	30	Amino	0,5	21,42	275359
Sancho y col. 2003	35-65 %	1	30	Amino	1,0	21,49	668009

Se mantienen los tiempos de retención y el tamaño de las áreas se corresponde con la concentración de las muestras.

FIGURA N° 2: Cromatogramas a 263nm. Columna amino 250mm. Blanco; vol. de inyección: 200 µl y espectros de absorción.

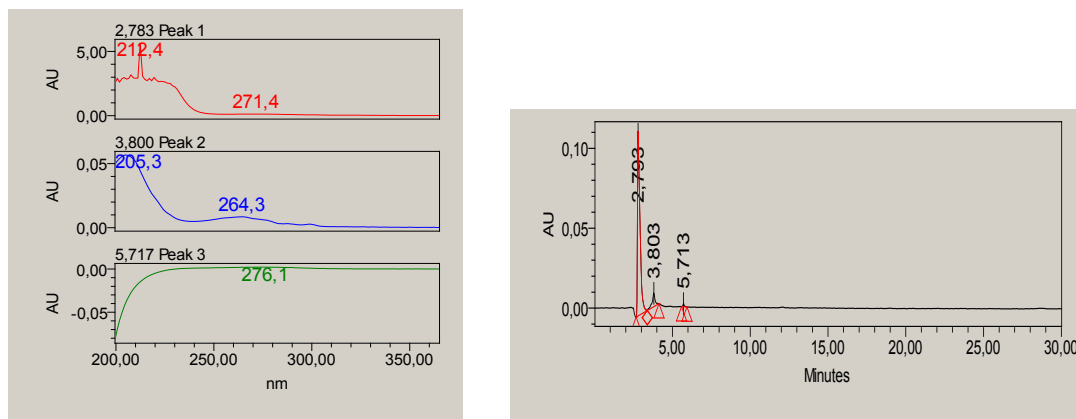


FIGURA N° 3: Cromatograma de muestras de concentración 0,5 ppm; vol. de inyección: 200 µl y espectros de absorción.

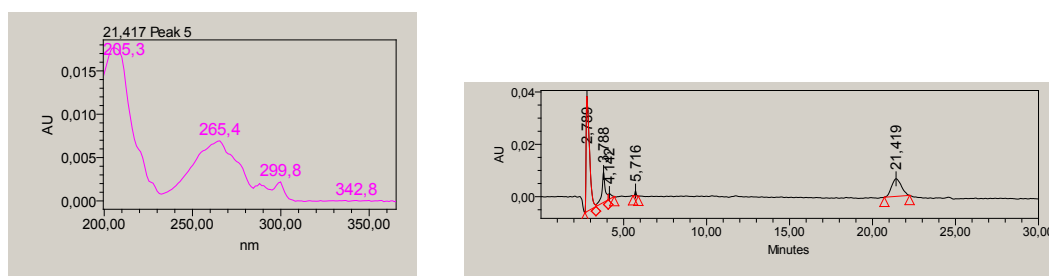
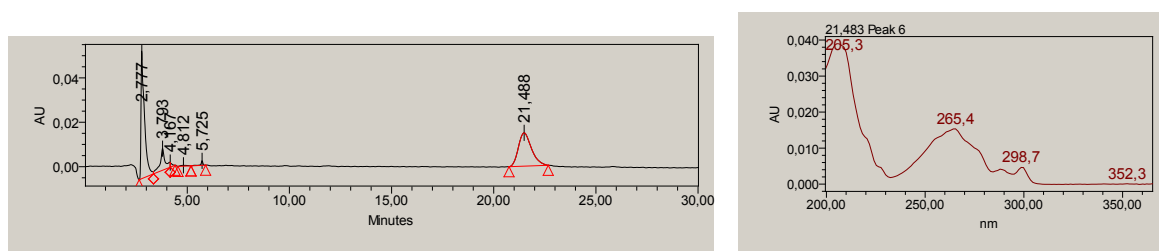


FIGURA N° 4: Cromatograma de muestras de concentración 1,0 ppm; vol. de inyección: 200 µl y espectros de absorción.



Se ha podido comprobar que el aumento del volumen de muestra ha mejorado considerablemente los resultados, y que la columna de intercambio aniónico débil como la amino, resulta más adecuada para la detección del glifosato.

Análisis de glifosato en abejas muertas

Desarrollo:

Se adaptó la metodología mencionada anteriormente y se reemplazó los cartuchos de intercambio iónico por una columna de Amberlita IRA 900 [2], y en función de ello se planteó el trabajo optimizando las siguientes etapas:

- a) Tratamiento de las abejas con Ácido Tricloroacético.
- b) Clean-up del analito.
- c) Derivatización del analito.
- d) Medición cromatográfica.

a) Tratamiento abejas con Ácido Tricloroacético: durante este tratamiento se busca separar las proteínas y lípidos que constituyen al cuerpo de la abeja, de modo de disminuir el número de sustancias interferentes. Para ello debe seguirse el siguiente esquema.

Descripción: se pesan 3g de abejas muertas; se pasan a un mortero y maceran con 10 ml de ác. Tricloroacético durante unos 5 min.

Seguidamente se filtra el contenido a través de una gasa impregnada en Ácido Tricloroacético (para evitar que se adsorban sustancias de interés en las fibras de la misma). Se recoge el filtrado en tubos de centrífuga. Para evitar pérdidas, se lava el pilón y el mortero con otros 5 ml de Ác. Tricloroacético, pasándolo a través de la gasa y se agrega al filtrado anterior.

Se centrifuga al máximo (aprox. 3000 rpm) durante 10 minutos para asegurar una perfecta separación de la parte sólida que precipita y el sobrenadante.

Se extrae el sobrenadante y se lo neutraliza con NaOH 1M.

- b) Clean-up del analito (glifosato) en muestras de abejas

Descripción: Todo el volumen del sobrenadante neutralizado (aprox. 25ml) se pasa por una columna de intercambio aniónico fuertemente básica como Amberlita IRA-900 a velocidad aproximada de 1ml por minuto, a fin de concentrar en analito antes de eluirlo y derivatizar.

Preparación de la columna de Amberlita IRA-900. Primeramente se activa la resina de amberlita secándola hasta peso constante a 65°C. Luego se pesa la cantidad necesaria para el relleno de la columna. Para el empaquetado se usan columnas de vidrio de 20 cm de largo x 1 cm de diámetro. En la base de la columna se coloca un trozo pequeño de algodón a fin de evitar pérdidas. Luego se le agrega la amberlita activada (1g por cada columna).

Se le agrega agua calidad HPLC para hidratarla y empaquetarla. Se espera a que la resina duplique su volumen y se observa que la columna quede bien empaquetada, sin burbujas de aire entre las partículas de amberlita. De esta forma queda lista para comenzar a eluir la muestra. [20]. Posteriormente se lava la columna con 10 ml de agua calidad HPLC a la misma velocidad (1ml/minuto), descartando otra vez el líquido recogido.

Se eluye el analito con 10 ml de ClNa 1M (1ml/minuto) y se recoge el eluato evaporando en rotavapor casi a sequedad. Se disuelve con la mínima cantidad de agua para HPLC y se enrasa a 10 ml y a 25 ml en matrás aforado. De ambas soluciones se toman 5 ml para derivatizar.

- c) Derivatización del analito.

Para la derivatización del analito se siguió el procedimiento explicado anteriormente. Se filtra el líquido obtenido por filtro de 0,20 µ y se inyectan 200 µl.

- d) Medición cromatográfica.

La determinación cromatográfica se realizó en las condiciones explicadas para el estándar.

Pruebas con muestras testigo (abejas fortificadas)

Se fortificaron abejas con glifosato sólido grado técnico. La prueba se hizo con fines cualitativos. Para comprobar la presencia o ausencia del pico del analito en el cromatograma.

Los resultados indican un pico bien definido al tiempo de retención esperado cuyo espectro de absorción corresponde al analito buscado como se observa en la figura siguiente.

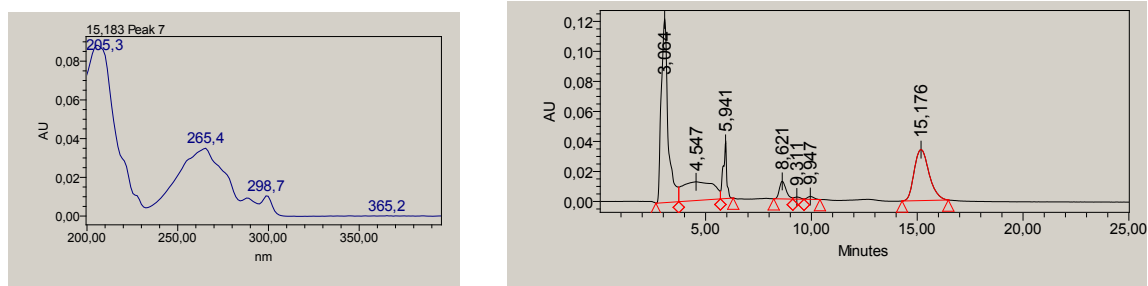


FIGURA N° 5: Cromatograma de muestras testigo

Para cuantificar el analito y conocer la recuperación del método se fortificaron los testigos con concentraciones conocidas de glifosato. Las áreas de los picos obtenidos es mucho menor a la que se espera encontrar, esto sugiere que existe un efecto matriz que afecta la cuantificación inhibiendo la señal, por lo que habría que corregir la extracción y limpieza del analito para tener resultados cuantificables y reproducibles. También hay que tener en cuenta que la detección del compuesto se está haciendo con un detector de red de diodos, por UV, que ha dado buenos resultados para matrices más simples como agua o suelos, aunque mejores resultados se han conseguido con detección de fluorescencia. Consideramos luego de las experiencias realizadas y las características químicas del analito, que para la identificación y cuantificación de glifosato y su metabolito AMPA hay que recurrir a equipos más sensibles y usar detector de masas, a fin de asegurar los resultados, lo mismo que columnas especiales para compuestos polares.

III.6. Análisis cromatográfico de muestras de abejas de la zona de Gualaguaychú

En el caso de las abejas muestreadas y analizadas, no se detecta el compuesto buscado en ninguna muestra. Con esto no se confirmaría la ausencia, sino que pensamos que no lo estamos detectando por el efecto matriz de la muestra.

Observamos que el uso de Amberlita IRA 900, sería de utilidad para concentrar el analito, pero antes habría que separarlo con otro tipo de resina como un cartucho C18 para la limpieza, y otro de intercambio catiónico, por ej. PolyPrep para completar la limpieza. Luego continuar con la elución con metanol 20 % en agua ácida.

Si se trabaja solo con amberlita, en las concentraciones que puede estar el glifosato en las abejas no sería detectable con ésta metodología. Se incorporaron estos cambios a la preparación de la muestra, pero los resultados siguen siendo no satisfactorios, lo que nos hace sugerir que el efecto matriz es muy importante y la detección UV no es suficiente.

Metodología para la determinación de glifosato en miel

Para la determinación de glifosato en miel se trabajó en conjunto con el Laboratorio Melacrom, de Mercedes, Pcia. Buenos Aires, laboratorio de alta complejidad, a fin de realizar las pruebas con equipos más sensibles. Se usó un Equipo UPLC Waters Acquity, Software: MassLynx v4.1. Detector TQD (Espectrometro de doble masa) y Columna Acquity UPLC BEH C18 1,7um 2,1 x 50mm. Se realizó el siguiente procedimiento:

Preparación del estándar

1 ml de Std preparado en agua. Adicionar 0.25ml buffer borato 10% pH9. Luego adicionar 0.25ml FMOCCI 10mM (en acetonitrilo). Dejar reaccionar overnight a 40°C (min 16horas). Diluir en con agua y adicionar 0.25 ml de acido fórmico. Acondicionar cartucho oasis HLB 3cc 60mg con metanol y luego con agua. Pasar por el cartucho la muestra derivatizada. Lavar con acido fórmico 0.1%. Eluir con 6 ml de Metanol. Llevar a sequedad. Resuspender en 1 ml de fase acuosa.

Preparación de la muestra de miel

Pesar 2.5g de miel diluir con 7.5ml agua. Tomar 1 ml de esta solución y proceder como se indica para el estándar.

Condiciones cromatográficas

Glifosato		
Tiempo	% A	% B
0	10	90
1	10	90
7	100	0
8	10	90
10	10	90

A: 5% agua + 95% Metanol + 0.1% Ac. Fórmico

B: 95% agua + 5% Metanol + 0.1% Ac. Fórmico

Columna Acquity UPLC BEH C18 1,7um 2,1 x 50mm

Temperatura Horno: 30°C

Temperatura Sample Inyector: 10°C

Condiciones TQD (Detector de Masas)

Glifosato	
Capillary (kV)	3,5
Cone (V)	20
Extractor (V)	1
RT Lens (V)	1
Source Temp (T)	120
Desolvation Temp (T)	350
Gas Desolvation (L/hr)	800
Gas Cone (L/hr)	80
Collision Gas Flow (ml/min)	0,25

Optimización de la reacción de derivatización y análisis de miel

Se logró optimizar la reacción de derivatización con el FMOCCI, y se logró un pico de buena sensibilidad en el LC MSMS. Se pudo comprobar que para que esta reacción se produzca linealmente (o sea, como se requiere para poder cuantificar la cantidad posible en la muestra), se necesita un exceso importante de derivatizante, por una cuestión de equilibrio químico puro.

Se realizó una comparación con estándares de glifosato en agua y se logró reducir la cantidad de FMOCCI en comparación con lo que indica la bibliografía, obteniendo en este caso buenos resultados. En cambio con la miel, se observa la aparición en el medio de reacción de otros grupos amino, además del que tiene el glifosato, que son propios de la miel, y en gran cantidad. En este caso para mantener la K del equilibrio químico de la reacción, hay que agregar un exceso importante del reactivo derivatizante (FMOCCI).

Después de observado este comportamiento, entendemos porqué la bibliografía disponible se limita solamente a agua o llega sólo hasta suelo. No hemos encontrado suficientes aplicaciones en alimentos, porque habría que agregar tanto FMOCCI en cada reacción, por los grupos amino acompañantes en la

muestra que también intervienen en la reacción y consumen derivatizante competitivamente, que ya se pierde la sustentabilidad del método.

La cromatografía en el LC MSMS pareciera dar buenos resultados, esto hoy sólo es posible si está derivatizado, pues el aumento de masa molecular produce un aumento de lipofilidad y por lo tanto tenemos un tiempo de retención aceptable. En una columna standard, el glifosato sin derivatizar no tiene interacción con el relleno y sale junto con el frente de la corrida.

En las muestras de miel se ha observado que la sensibilidad y la linealidad se reducen drásticamente. Estos resultados se muestran a continuación, incluyen el informe del equipo de una tanda con curva de calibración en solvente del glifosato y AMPA (sin incluir) derivatizados, un blanco de miel y tres niveles de fortificación en miel, de concentraciones similares a los de la curva. Se muestra el nivel 1.

Se buscaron dos transiciones de masa que se confirman mutuamente: 932 a 88.1 (que es la que se usa para la cuantificación) y 392 a 241.1 (se usa sólo para confirmación de identidad).

El anexo consta de tabla resumen de resultados, curva de calibración y residuales, y cromatogramas.

Se puede observar que en miel no sale prácticamente nada en comparación con glifosato en solvente.

TABLA N° 2: Resumen de resultados

Compound name: Glifosato FMOCCI

#	Name	Type	Std. Conc	RT	Quan Trace	Area	ug/l	%Dev	1° Trace	1° Area	1° Ratio ...
1	120417 GLIFOSATO SPE NIVEL 1 1	Standard	25.0	6.07	392>88.1	3010.1	29.1	16.4	392>214.1	750.7	4.010
2	120417 GLIFOSATO SPE NIVEL 2 1	Standard	250.0	6.07	392>88.1	35286.9	244.7	-2.1	392>214.1	8816.4	4.002
3	120417 GLIFOSATO SPE NIVEL 3 1	Standard	1000.0	6.07	392>88.1	148299.6	1001.2	0.1	392>214.1	37396.8	3.966
4	120417 MIEL BLANCO spe 1	Analyte		6.06	392>88.1	1042.0	6.3		392>214.1	216.7	4.809
5	120417 MIEL NIVEL 1 spe 1	Analyte		6.07	392>88.1	662.6	5.4		392>214.1	169.0	3.921
6	120417 MIEL NIVEL 2 spe 1	Analyte		6.07	392>88.1	2720.4	10.8		392>214.1	659.5	4.125
7	120417 MIEL NIVEL 3 spe 1	Analyte		6.06	392>88.1	704.2	5.5		392>214.1	168.0	4.192

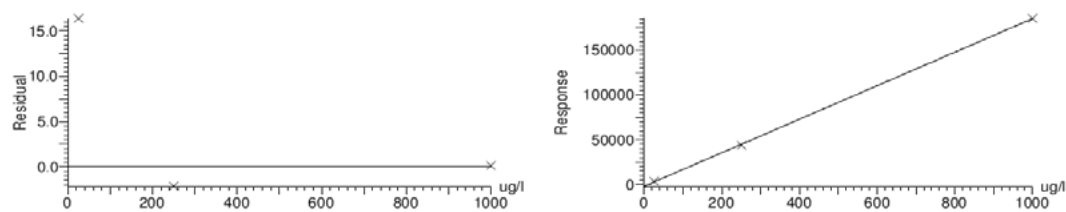
Compound name: Ampa FMOCCI

#	Name	Type	Std. Conc	RT	Quan Trace	Area	ug/l	%Dev	1° Trace	1° Area	1° Ratio ...
1	120417 GLIFOSATO SPE NIVEL 1 1	Standard	25.0		334>179.1				334>112.1		
2	120417 GLIFOSATO SPE NIVEL 2 1	Standard	250.0		334>179.1				334>112.1		
3	120417 GLIFOSATO SPE NIVEL 3 1	Standard	1000.0		334>179.1				334>112.1		
4	120417 MIEL BLANCO spe 1	Analyte			334>179.1				334>112.1	25.3	0.000
5	120417 MIEL NIVEL 1 spe 1	Analyte			334>179.1				334>112.1	37.1	0.000
6	120417 MIEL NIVEL 2 spe 1	Analyte			334>179.1				334>112.1		
7	120417 MIEL NIVEL 3 spe 1	Analyte			334>179.1				334>112.1		

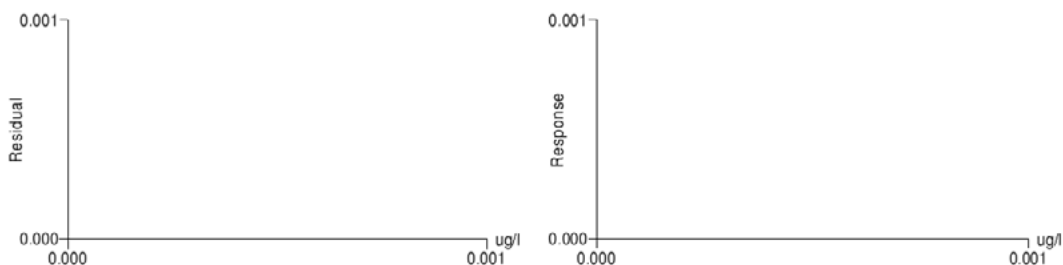
FIGURA N° 6: Curvas de calibración

Method: C:\MassLynx\Plaguicidas.PRO\MethDB\glifosato ampa fmoc_cl.mdb 17 Apr 2012 17:42:00
 Calibration: 02 May 2012 14:19:22

Compound name: Glifosato FMOCCI
 Correlation coefficient: $r = 0.999955$, $r^2 = 0.999910$
 Calibration curve: $187.152 \cdot x + -1686.12$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Ampa FMOCCI
 No Calibration
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

**FIGURA N° 7:** Cromatograma del estándar

Method: C:\MassLynx\Plaguicidas.PRO\MethDB\glifosato ampa fmoc_cl.mdb 17 Apr 2012 17:42:00
 Calibration: 02 May 2012 14:19:22

Compound Name: Glifosato FMOCCI

Sample Name: 120417 GLIFOSATO SPE NIVEL 1 1
 120417 GLIFOSATO SPE NIVEL 1 1

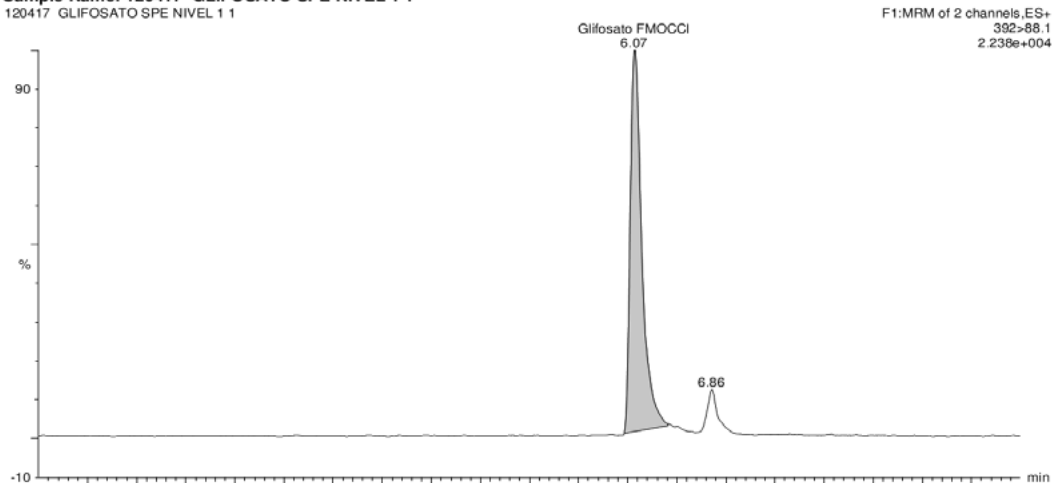
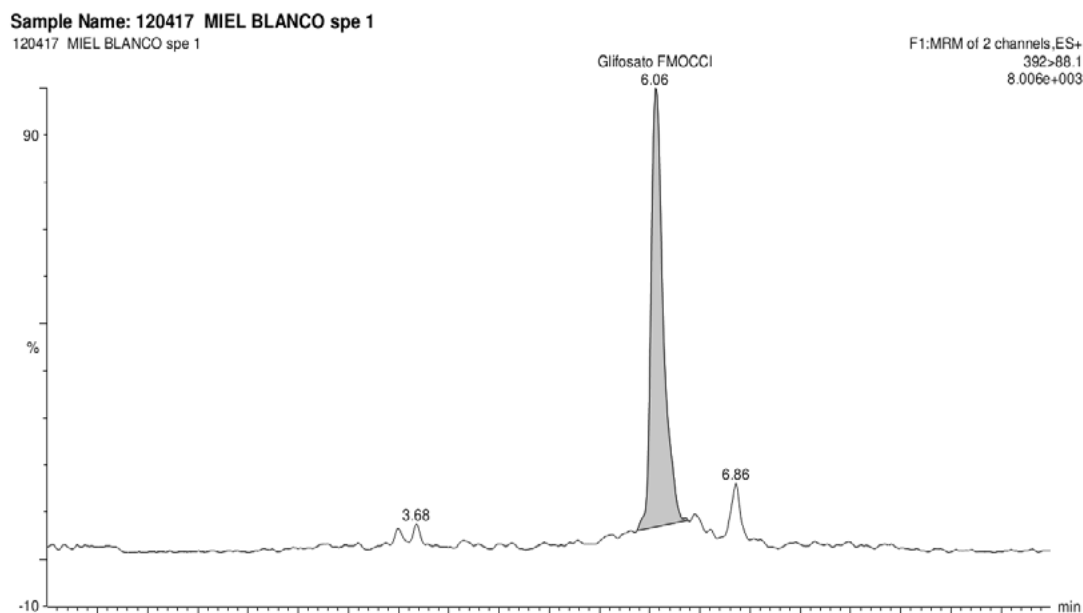
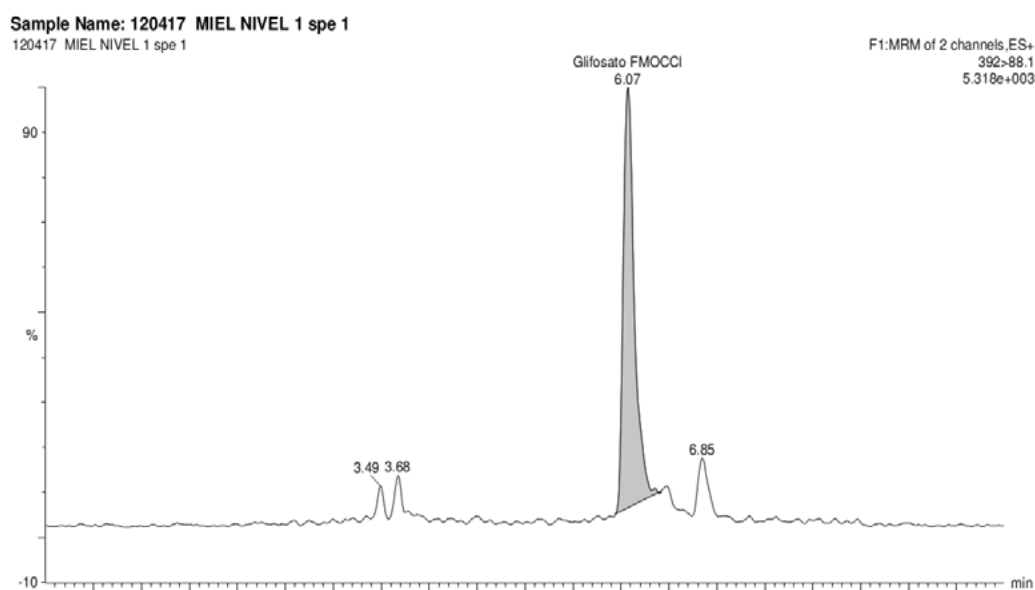


FIGURA N° 8: Cromatograma blanco de miel**FIGURA N° 9:** Cromatograma de miel fortificada nivel 1

IV. Conclusiones

1. La Provincia de Entre Ríos presenta la mayor área geográfica cultivada con soja, teniendo rindes entre 600 Kg/ha y 3.500 Kg/ha por lo que participa en forma importante en el promedio nacional.
2. El Glifosato es el herbicida más usado para los cultivos de soja, en mayor cantidad y sobre la mayor superficie de aplicación. Con ese crecimiento, la siembra de soja encabeza la demanda de pesticidas.

3. Se ha observado en la revisión bibliográfica que en nuestro país los sistemas de control no han incluido al glifosato en los planes de seguimiento rutinario, como por ejemplo el plan CREHA de la Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación y SICOHOR de SENASA. Creemos que por tratarse de un compuesto problemático desde el punto de vista analítico no integra los programas de control y es efectuado en forma de compuesto individual con las moléculas relacionadas como AMPA.
4. Argentina es un país esencialmente productor de alimentos, y en lo que se refiere a la apicultura, es uno de los principales productores y exportadores de miel, por lo que el Estado debería implementar sistemas de monitoreo y control de residuos de plaguicidas incluido el glifosato, para que no se convierta en una barrera arancelaria para los países compradores incluyendo el biomonitoreo ambiental.
5. Es necesario asesorar e insistir en que las técnicas de aplicación de glifosato se realicen respetando las condiciones atmosféricas en cuanto a velocidad y dirección del viento, temperatura y humedad.
6. Es necesario una mayor concientización del sector agropecuario, sobre la influencia de las fumigaciones en los cultivos, sobre la situación que ha creado puntualmente el cultivo de soja, avanzando sobre áreas naturales, con pastizales naturales y praderas cultivadas.
7. El biomonitoreo con abejas es una técnica útil de investigación de la contaminación ambiental, pero en el sector apícola existe mucha resistencia por parte de los apicultores en colocar las unidades de monitoreo en los campos donde producen, porque no son dueños directos y manifiestan miedo a represalias futuras.
8. Los resultados del biomonitoreo demuestran que la mortandad de abejas no supera el límite del "umbral de normalidad." (de 100 a 120 abejas) en la mayoría de los casos. Esto indicaría que el lugar geográfico elegido y su entorno presenta buenas características ambientales y productivas, buena oferta floral, buena genética de las abejas y mejor calidad ambiental circundante.
9. Los vientos y la deriva afectan directamente los apiarios de la zona de estudio, el transporte de glifosato por aire, desde el sitio de aplicación puede ocurrir principalmente por efecto de la deriva y lo hace en un corto período de tiempo, durante o después de la aplicación.
10. En este estudio los efectos no detectados pueden producirse porque no existen o porque no existe suficiente evidencia debido al bajo número de unidades experimentales utilizadas. Si se hicieran nuevos ensayos sería recomendable utilizar mayor número de colmenas y contador electrónico de abejas para eliminar el factor riesgo humano en las proximidades de la colmena.
11. Las matrices que se eligieron para el estudio son muy adecuadas, solo que es muy difícil adaptar una metodología analítica para la detección y cuantificación de glifosato. La "matriz abeja" integra espacio y tiempo de manera puntual y a corto plazo. La "matriz miel" integra espacio y tiempo, pero en plazos más prolongados por la reelaboración y deshidratación del néctar. Por lo tanto, la presencia de contaminación puede identificarse a través de la "matriz abeja", y su eventual persistencia puede ser confirmada a través de la "matriz miel".
12. Se destaca la complejidad de las metodologías para determinar glifosato en éstas matrices, sus características físicas y químicas hacen que su comportamiento respecto a estabilidad química, persistencia y su residualidad presente mucha variación según la característica del sustrato en que se encuentre. Sin duda la metodología analítica para su control es un problema, dado que los requerimientos en cuanto a valores normales varían para los distintos materiales, desde por ejemplo 0,1-1 µg/l para aguas, 0,01 mg/Kg para alimentos infantiles y 0,1 mg/Kg para cereales y sus productos.
13. Los métodos propuestos basados en la cromatografía líquida y de gases con distintos

detectores, adolecen la dificultad del procedimiento ya que la mayoría se basa en reacciones de derivatización, lo que para bajos niveles y matrices complejas como los alimentos y/o productos biológicos redundan en límites de cuantificación relativamente elevados (superiores a 0,1 mg/Kg) y dificultades respecto a la selectividad y la laboriosidad del procedimiento.

14. La cromatografía líquida con detector de red de diodos ha dado buenos resultados con la solución estándar, derivatizada, pero no se han obtenidos resultados satisfactorios con las matrices abejas y miel.
15. El proceso de derivatización del glifosato ofrece muchas dificultades tanto para la metodología como para los insumos. Al usarse un reactivo derivatizante que ataca los grupos amino de la muestra si no se elimina totalmente, ataca también los grupos amino de la columna y acorta considerablemente la vida útil de ésta, por lo cual el método se transforma en muy costoso y deja de ser rentable.
16. Con las matrices estudiadas, no se logra la total derivatización y el exceso de derivatizante, si se hace la detección con detector de fluorescencia en vez de UV, aparece como un pico contaminante enmascarando resultados.
17. La etapa de extracción y clean-up ofrece muchas dificultades por ser matrices complejas, y no se obtiene una recuperación del método aceptable, por lo que consideramos que la Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de Red de Diodos y medición en UV no es aconsejable para la determinación analítica de glifosato por su baja sensibilidad.
18. Con cromatografía Ultra HPLC y detector de Masas, se han tenido similares problemas en el proceso de derivatización aunque se logró optimizar la reacción y obtener un pico de buena sensibilidad, pero para que esta reacción se produzca linealmente (o sea, como se requiere para poder cuantificar la cantidad posible en la muestra), y por una cuestión de equilibrio químico, se necesita un exceso importante de derivatizante, lo que encarece considerablemente el método perdiendo sustentabilidad.
19. En las muestras de miel se ha observado que la sensibilidad y la linealidad se reducen drásticamente lo mismo que con abejas.
20. La cromatografía en el LC MSMS pareciera dar buenos resultados, esto hoy sólo es posible con la muestra derivatizada. En una columna standard, el glifosato sin derivatizar no tiene interacción con el relleno y sale junto con el frente de la corrida.
21. Consideramos que las investigaciones sobre una metodología para determinar glifosato deben orientarse al uso de equipos como LC MSMS y utilizar columnas con rellenos especiales para productos muy polares que permita cromatografarlo directamente sin recurrir al proceso de derivatización.

Indicadores de Producción

- Se colocó un apiario experimental en una zona cercana a cultivos de soja, en las afueras de la ciudad de Gualeguaychú, lo que permitió cumplir con el muestreo de abejas muertas en una período completo de siembra y fumigación del mencionado cultivo.
- Se obtuvieron muestras de miel del apiario experimental en época de producción.
- Los datos del relevamiento de abejas han permitido confeccionar gráficos de mortalidad.
- Se ha podido estandarizar las mejores condiciones para el análisis de glifosato con la solución patrón de glifosato y con abejas muertas desde el punto de vista cualitativo.
- Se realizó la confirmación de la metodología con los estándares con buenos resultados.
- Los resultados finales en relación al desarrollo de la metodología con las muestras se logró con otros materiales, otra columna, detector y equipo de ultra HPLC.

Presentación en eventos científicos:

- “Empleo de la abeja melífera como bioindicador de contaminación ambiental con herbicidas en áreas cultivadas con soja en la Pcia. de Entre Ríos y su relación con el contenido residual en la miel”. Presentado en las XXVII Jornadas Regionales de Bromatología y XII de Nutrición. Facultad de Bromatología. Año 2010.

- “Propóli’s antioxidant capacity and its relationship with its phenolic composition”. Presentado en 42nd International apicultural Congress. Apimondia 2011. From 21st to 25th September 2011. Buenos Aires. Argentina.

- “Study of phenolic compounds in chilca honeys”. Presentado en 42nd International apicultural Congress. Apimondia 2011. From 21st to 25th September 2011. Buenos Aires. Argentina.

- Transferencia de resultados: se realizó una Jornada de Transferencia de resultados a los productores apícolas e instituciones que celebraron convenio con la Facultad para el desarrollo del proyecto.

- Se ha cumplido con la formación de recursos humanos: dos tesinas de grado aprobadas, una tesis doctoral en ejecución en el exterior. Una pasantía de capacitación durante un año.

Bibliografía

- [1] Plan de Tecnología Regional 2001-2004. Documentos Institucionales 109. Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria. 2002. Centro regional Entre Ríos.
- [2] Sancho Llopis, J. V. Determinación de Residuos de Herbicidas Polares Mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Aplicación a técnicas Acopladas. Universitat Jaume I de Castello. 1994. Tesis.
- [3] A. Onorato & M. O. Tesouro. Pulverizaciones Agrícolas Terrestres. Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria. 2006. (1ª Ed.).
- [4] Cook, Joanne; Pat Beckett, M., Reliford, B. Multiresidue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetable using procedures by the Florida Department of Agriculture and Consumer Services. Journal of AOAC International 1999 Vol. 82, Nº6.
- [5] Donadio de Gandolfi, Ma. C.; García, S. I.; Ghersa, C. M. ; Haas, A. I. ; Larripa, I.; Marra, C. A. ; Ricca, A. et al. Evaluación de la Información Científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. Consejo Nacional De Investigaciones Científicas Y Técnicas. . Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos. Julio, 2009. Eds. Buenos Aires. Autor.
- [6] Las Normas de Higiene Alimentaria en la UE y sus implicancias para la Argentina. Secretaría De Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Subsecretaria de Política Agropecuaria y Alimentos. Dirección Nacional de Mercados. Dirección de Relaciones Agroalimentarias Internacionales. 2005.
- [7] CODEX ALIMENTARIUS. Glifosato. 2009. disponible en URL: [www.Codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp](http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp)
- [8] SUBSECRETARÍA DE RECURSOS HÍDRICOS DE LA NACIÓN REPÚBLICA ARGENTINA, SRHSNA. Desarrollo de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente correspondientes a Glifosato. 2003.
- [9] Informe de la 18ª reunión del comité del CODEX sobre principios generales. ALINORM 03/33ª. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comisión del CODEX Alimentarius. 26º período de sesiones. Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura y La Alimentación. 2003. Roma, 30 de junio – 7 de julio de 2003. París: Autor.
- [10] Root. Abc y Xyz de la apicultura. (14º ed.). Traducción de T. L. Mulvany. Buenos Aires: Librería Hachette S. A. 1982.
- [11] Fundación amigos de las abejas. [Internet]. Guadalajara. España. 2009. Citado 2010. Disponible en http://www.abejas.org/las_abejas/las_abejas.htm
- [12] Tasinato Hugo S.E.P. (s.f.). Trampa para medir cantidad de abejas muertas durante tratamientos antivarroa. [Internet]. Santa Fé. Argentina. 2008. [Citado el 9 Marzo, 2009]. Disponible en <http://www.sada.org.ar/Articulos/Tecnicos/trampa.htm>

- [13] Sancho, J. V.; Hernández, F.; López, F. J.; Hogendoorn, E. A.; Dijkman, E. & Van Zoonen, P. Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid. *Journal of chromatography A*. 1996. 678, 59-67.
- [14] Stalikas, C. D., and Konidari, C. N. Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. *J. Chromatogr. A*. 2001. 907:1-19.
- [15] Veiga F., Zapata J.M., Fernandez Marcos M. L., Alvarez E. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *Sci. Total Environ.* 271, 2001. 135-144.
- [16] Porrini, C., et. al. "Honey bee and bee products as monitors of the environmental contamination". *Apiacta* 2003. 38:63-70.
- [17] Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales de EE. UU. Rurales CSG 15. "Desarrollo y mejora de los métodos de análisis para la Vida Silvestre de investigación de incidentes medioambientales (WIIS)". [Internet]. Informe final 2002. Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, YO41 1LZ. [Citado 2009]. Disponible en http://randd.defra.gov.uk/Document.aspx?Document=PR1150_871_FRP.doc
- [18] Peruzzo P., Marino, D.; Cremonese, C., da Silva, M Porta A & Ronco A. Impacto de Pesticidas en Aguas Superficiales y Sedimentos Asociado a Cultivos por Siembra Directa. Conferencia Internacional Usos Múltiples del Agua: Para la Vida y el Desarrollo Sostenible. (pp137-142). Universidad del Valle/ Instituto Cinara. [Internet] 2003. [Citado el 4 Febrero de 2009] disponible en www.bvsde.paho.org/bvsacd/agua2003/culti.pdf
- [19] Miles, C. J., Wallace, L. R., and Moye, A. H. Determination of glyphosate herbicide and aminomethylphosphonic acid in natural waters by liquid chromatography using pre-column fluorogenic labelling with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *J. AOAC*, 1986. 69:458-461.
- [20] Hidalgo, C., Rios, C., Hidalgo, M., Salvadó, V., Sancho, J. V. & Hernández, F. Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters. *Journal of Chromatography A*. 1035, 2004. 153–157.